

产果胶酶黑曲霉的 UV 诱变 及基于葡萄皮渣的固态发酵

黄丹梅¹, 宋育阳^{1,2}, 刘延琳^{1,2}, 秦 义^{1,2,*}

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100;

2.陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要:对产果胶酶的黑曲霉进行紫外诱变,使用透明圈法并结合液态发酵法进行筛选,获得果胶酶产量提高的黑曲霉菌株,并利用葡萄皮渣进行固态发酵生产果胶酶。结果表明,H40741、H40493、H40982、H41133、H41134、H41034、H40493和H22148等8株黑曲霉中,H40741产果胶酶最高,对其进行0~360 s紫外诱变,获得高产果胶酶突变菌株H40741-20,其在果胶液态发酵培养基中可获得酶活力为462.84 U/mL的果胶酶,是出发菌株的3倍。通过优化固体发酵培养基中的葡萄皮渣、麦麸和水的含量,获得较佳培养基配方为:葡萄皮渣50 g,麸皮50 g,水100 mL,硫酸铵2 g,硫酸镁0.07 g,硫酸钾0.1 g。H40741-20利用此固态培养基发酵,可获得酶活力为421.06 U/mL果胶酶,是出发菌株H40741的2.7倍。

关键词:果胶酶,黑曲霉,紫外诱变,固体发酵,葡萄皮渣

UV mutagenesis of *Aspergillus niger* for increasing pectinase production and its solid-state fermentation using grape skin residue

HUANG Dan-mei¹, SONG Yu-yang^{1,2}, LIU Yan-lin^{1,2}, QIN Yi^{1,2,*}

(1.College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2.Shaanxi Engineering Research Center for Wine and Viticulture, Yangling 712100, China)

Abstract: For increasing pectinase production, UV light was used to produce *Aspergillus niger* mutagenesis, and the grape skin residue was used to produce pectinase by *Aspergillus niger*. The results showed that, in the eight *Aspergillus niger* strains H40741, H40493, H40982, H41133, H41134, H41034, H40493 and H22148, the H40741 has the highest pectinase activity. Ultraviolet light on H40741 spores 0~360 s, and we obtained a high yield pectinase mutant strain H40741-20. The pectinase activity was 462.84 U/mL in pectin liquid fermentation medium, which was 3 times of the original strain. By optimizing the contents of grape skin residue, wheat bran and water, we obtained a better medium formula was grape skin residue 50 g, wheat bran 50 g, water 100 mL, ammonium sulfate 2 g, magnesium sulfate 0.07 g, potassium sulfate. The pectinase enzyme activity was 421.06 U/mL, which was 2.7 times higher than that of the original strain H40741 by using this optimized solid medium.

Key words: pectinase; *Aspergillus niger*; UV mutagenesis; solid-state fermentation; grape skin residue

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)17-0125-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.024

果胶在不同程度上影响天然产物的释放,在适宜条件下,添加果胶酶有利于天然产物的提取^[1-2]。果胶酶是指能够分解果胶物质的一种复合酶的总称^[3-6]。果胶酶包含聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)、果胶裂解酶(pectin lyases, PL)、果胶甲酯酶(pectin esterases, PE)和原果胶酶等。

微生物生产果胶酶的来源极其广泛,包括真菌、细菌、放线菌,如:假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆

菌属(*Bacillus*)、欧文氏菌(*Erwinia*)、酵母属(*Saccharomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)等^[7-8]。黑曲霉是国际公认的安全菌株(generally regarded as safe, GRAS),也是美国(FDA)认可使用安全产酶微生物之一,其代谢产物可直接用于食品、饮料、造纸等行业^[9-10]。诱变育种是通过诱变剂作用于微生物菌种,并寻找正向突变菌株的一种诱变方法,此方法具有简单、快速、有效等特点^[11-16]。近年国内外学者,如陈勇强^[17]、余秋生^[18]、N Jafari^[19]、G Izmirlioglu^[20]等人在

收稿日期:2017-01-20

作者简介:黄丹梅(1992-),女,在读硕士研究生,研究方向:酿酒微生物,E-mail:hdmhuang92@163.com。

* 通讯作者:秦义(1982-),男,博士,讲师,研究方向:酿酒微生物学,E-mail:qinyi@nwsuaf.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金(3050215184);国家现代农业(葡萄)产业技术体系建设专项(CRAS-30-jg-3)。

黑曲霉的筛选、原生质体选育与诱变育种相结合方面取得了显著的成果。这些方法是通过诱变因子修改目的微生物的基因组,从而产生突变型菌株。

利用微生物固态发酵(Solid State Fermentation, SSF)生产果胶酶具有原料成本低、来源广,工艺操作简单,发酵过程中不需要严格执行无菌操作,基质含水量低,反应容器体积小,无环境污染^[21]等优点。我国葡萄酒厂众多,且分布广泛。每年葡萄酒的生产位居世界前列,同时也产生大量的葡萄皮渣,约占葡萄加工量的25%~30%^[22-24]。葡萄皮渣中含有大量的营养物质,如酚类物质(poly-phenolic compounds, PP)含量可达285~550 mg/kg^[25],花青素的含量为6.96 mg/g^[26],葡萄籽油约占葡萄籽重量的9%~17%^[27],同时葡萄皮渣中也含有一定量的果胶^[28]。在过去葡萄酒的酿造过程中,葡萄皮渣被当做废弃物扔掉,不仅浪费资源,也污染环境。对葡萄皮渣进行废物重新综合利用,不仅实现了资源利用的最大化,也降低了对环境的污染。与固态发酵相比,采用液态发酵法进行筛选具有发酵时间短、易操作等优点。因此,本研究采用透明圈法与液态发酵法相结合进行筛选高产果胶酶的黑曲霉菌株,并对筛选所得菌株进行葡萄皮渣固体发酵,为利用葡萄皮渣固体发酵生产果胶酶奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

黑曲霉 H40741、H40493、H40982、H41133、H41134、H41034、H41278 和 H2214 中国工业微生物菌种保藏管理中心。

葡萄皮渣 赤霞珠葡萄经压榨并进行自然晒干后获得,其果胶含量约为1%~1.6%;麦麸 集贸市场;实验果胶 上海源叶生物科技有限公司;半乳糖醛酸 北京索莱宝科技有限公司;3,5-二硝基水杨酸 国药集团化学试剂有限公司;硫酸镁、硝酸钠、硫酸铁、硫酸铵、硫酸钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠、氯化钠、丙三醇等均为分析纯级。

UV1800 紫外可见分光光度计 Agilent Technologies;PB-10 酸度计 北京赛多利斯仪器系统有限公司;QYC-2112 型恒温摇床 上海福马实验设备有限公司;MJPS-250 霉菌培养箱 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂的配制 DNS 试剂:3.25 g 3,5-二硝基水杨酸,162.5 mL 2 mol/L 氢氧化钠,22.5 g 丙三醇,定容至 500 mL^[29]。

pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液^[29]:取 71.62 g 十二水合磷酸氢二钠,21.01 g 柠檬酸,分别定容至 1000 mL,按 10.3:9.7 混合。

卢戈氏碘液:将 2 g 碘化钾溶解于少量蒸馏水中,再将 1 g 碘溶解在碘化钾溶液中,待碘溶解完全后定容至 300 mL,避光保存。

1.2.2 培养基 斜面培养基(PDA) 200 g 马铃薯(去皮,切块,加水,煮沸 30 min,破碎,用纱布过滤,滤液加糖,定容至 100 mL),20 g 琼脂,20 g 葡萄糖,1000 mL 蒸馏水,pH 自然。

果胶培养基(%) 0.1 g 磷酸氢二钾,0.5 g 硫酸镁,0.3 g 硝酸钠,0.001 g 硫酸铁,2.0 g 琼脂,0.2 g 实验果胶,pH5.5^[30-31]。

液态发酵培养基(%) 0.1 g 磷酸氢二钾,0.5 g 硫酸镁,0.3 g 硝酸钠,0.001 g 硫酸铁,0.2 g 实验果胶,pH5.5。

1.2.3 高产果胶酶菌株的筛选 依据 Qu E J 等^[16]的研究透明圈直径(Dp)与菌落直径(Dc)比值较大产果胶酶的酶活相应较高。为了获得产果胶酶酶活最高的黑曲霉菌株,本实验对初筛中 Dp/Dc 比值较大的几株黑曲霉菌株进行复筛。

初筛:将黑曲霉菌种接种于 PDA 斜面培养基上,28 ℃ 条件下恒温培养 5~7 d。将培养好的黑曲霉斜面菌株存放于-4 ℃ 冰箱中。取活化好的斜面菌株 1 支,加入无菌水冲洗孢子,制成均匀的孢子浓度为 10⁶ 个/mL 的孢子悬液,将菌悬液分别稀释 10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³ 倍。用移液枪吸取 100 μL 稀释后的菌液接种在无菌果胶平板培养基上(每个梯度做 3 个平行),涂抹均匀,倒置于 30 ℃ 条件下恒温培养 3~4 d^[15]。将平板上的单菌落保藏于甘油冻存管中,再向平板中加入 5 mL 卢戈氏碘液,静止 2 min 后将碘液倒出,再加入 5 mL 生理盐水放置 10 min 后倒出,24 h 后可见明显透明圈,选取透明圈直径(Dp)与菌落直径(Dc)比值较大的菌^[16]进行复筛。

复筛:准确称取半乳糖醛酸 1.0 g,用 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液定容至 1000 mL,得到 1 mg/mL 的半乳糖醛酸标准溶液。取 9 支 25 mL 的具塞管并编号,并按表 1 加入各种试剂,混合均匀,沸水浴 5 min,流水冷却,加蒸馏水定容至 25 mL,用紫外分光光度计在 540 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度值(A)为横坐标,半乳糖醛酸浓度(B mg/mL)为纵坐标,绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $B = 1.6269 \times A - 0.0118$ ($R^2 = 0.9982$)。

在 300 mL 锥形瓶中加 100 mL 液体果胶培养基,用接种环沾取菌种接于液体培养基中,28 ℃,

表 1 标准样配制
Table 1 Preparation of standard sample

试剂(mL)	试管号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
糖标准液(mg·mL ⁻¹)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
蒸馏水	4.0	3.8	3.6	3.4	3.2	3.0	2.8	2.6	2.4
DNS	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
半乳糖醛酸含量(mg·mL ⁻¹)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6

260 r/min 条件下培养 2~3 d, 将培养液于 3600 r/min 下离心 8 min, 取上清液作为待测粗酶液。

1.2.4 果胶酶酶活测定 采用 DNS 法测果胶酶酶活力, 在 15 mL 具塞管中加入 0.8 mL 1.0% 的果胶溶液, 50 ℃ 恒温水浴 3 min, 加入 0.2 mL 适当稀释的粗酶液, 精确反应 10 min 后加入 3 mL DNS, 混匀后沸水浴 10 min, 流水冷却, 蒸馏水定容至 15 mL, 在紫外分光光度计 540 nm 波长处测定吸光值, 以灭活酶液为空白对照^[32-33]。酶活力计算:

$$X(U/mL) = [(A_1 - A_2) \times D_r \times 3] / (K \times t) \quad \text{式(1)}$$

式(1)中 A_1 为样品吸光度值, A_2 为空白对照吸光度值; K 为标准曲线的斜率, D_r 是稀释倍数; t 为反应时间(h)。

1.2.5 紫外诱变 紫外照射剂量: 取 28 ℃ 培养 5 d 的上述步骤 1.2.4 所得到的酶活力最高的菌株, 用 0.9% 的生理盐水冲洗孢子, 将孢子悬浮液置于无菌的锥形瓶中, 放入几粒玻璃珠振荡使孢子分散, 用四层无菌擦镜纸过滤, 然后用生理盐水将孢子悬浮液浓度调整到 10^6 个/mL, 该步骤在血球计数板上计数^[34]。取 7 个直径 9 cm 培养皿, 分别加入 6 mL 上述孢子悬浮液。将 15 W 的紫外灯打开, 预热 20 min 使光波稳定。将盛有悬浮液的培养皿置于距紫外灯垂直距离 30 cm 处, 打开培养皿盖子照射(照射计时从开盖起, 加盖停), 照射时间分别为 0、60、120、180、240、300、360 s。从每个照射时间的培养皿中取出菌悬液, 分别稀释 10、100、1000 倍。吸取 100 μ L 稀释后的菌悬液, 涂布于果胶平板培养基上, 每个浓度做 3 个平行, 全程均在红光灯下进行。将培养皿用铝箔纸包裹以避光, 放置于 28 ℃ 培养箱中倒置培养 3~4 d, 待菌落长好后计算不同照射时间下的致死率并保存, 计算公式为

$$F(\%) = [(A - B) / A] \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式(2)中 F 为致死率; A 为原菌落数; B 为诱变后菌落数。

突变株的筛选: 将上述诱变菌株计数并保存后采用卢戈氏碘液染色法, 分别观测透明圈直径(D_p)与菌圈直径(D_c)大小, 并计算 D_p/D_c 比值, 找出 D_p/D_c 比值大的菌株进行酶活力测定。

突变株酶活力的测定: 将筛选得到的突变菌株进行活化培养, 制备粗酶液。然后采用上述步骤 1.2.4 所述方法测定突变菌株的果胶酶酶活力。

1.2.6 形态观察 采用插片法^[34]将灭菌后的盖玻片斜插在培养基上, 用接种环将菌种接种在盖玻片一侧, 放入培养箱 28 ℃ 条件下培养 4~5 d, 电子显微镜下观察菌株形态。待菌株生长后用无菌刀片切一小块长有菌落的培养基, 于电子显微镜下进行观察并拍下照片。将剩下的培养基继续放置培养箱中, 定期取出进行电子显微镜观察与拍照。

1.2.7 突变株和出发菌株固体发酵 葡萄皮渣用于固态发酵^[35]的培养基配方为: 葡萄皮渣的添加量分别为 0、10、30、50、70、90 g, 采用麦麸补足至 100 g, 每组分别添加 100、200 mL 水, 均添加 2 g 硫酸铵, 0.07 g 硫酸镁, 0.1 g 硫酸钾, 以进行固体发酵培养基中葡萄皮渣、麦麸与水的配比优化。

将筛选得到的出发菌株和上述步骤 1.2.4 测得酶活力最高的突变菌株进行固体发酵, 发酵培养基灭菌后接入 2 mL 孢子悬浮液, 28 ℃ 条件下培养 4~5 d。固体发酵结束后, 将锥形瓶中的培养基转移至烧杯中, 并在烧杯中加入料液比 1:10 (g: mL) 的含 0.01% 吐温-80 的蒸馏水, 在 30 ℃ 条件下恒温浸提 50 min 后用 3 层纱布进行过滤, 将所得液体在 4000 r/min 下离心 15 min, 所得上清液即为粗酶液^[30], 并测定其果胶酶酶活力, 方法同上述步骤 1.2.4。

1.3 数据统计分析

用软件 Origin 8 绘制出黑曲霉菌株筛选和发酵的果胶酶酶活力图, 用 SPSS 进行差异显著性分析, $p < 0.05$ 差异显著。

2 结果与讨论

2.1 产果胶酶菌株的筛选

通过采用果胶培养基培养对 H40741、H40493、H40982、H41133、H41134、H41034、H41278 和 H2214 等八株黑曲霉菌株进行定性筛选。根据菌株的生长情况和水解果胶的能力, 采用卢戈氏碘液染色法筛选出 D_p/D_c 比值较大的菌株。通过初筛得到 H40741、H41134、H41133 和 H40982 四株菌株的 D_p/D_c 比值分别为 2.2、1.4、1.5、1.4, 较另外四株黑曲霉的 D_p/D_c 比值大, 如图 1 所示。

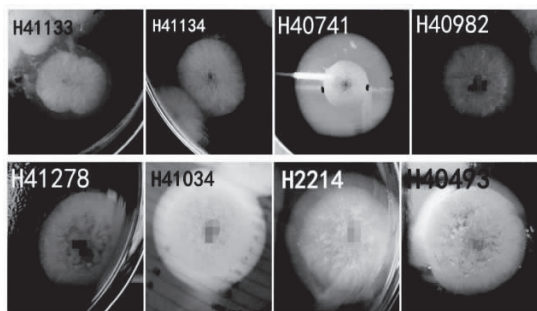


图1 八株黑曲霉菌株染色后的透明圈

Fig.1 Transparent circle of eight aspergillus niger strains after dyeing

从图 2 可以看出, 黑曲霉菌株 H40741 的酶活高于其他菌株, 酶活力达到 154.15 U/mL。据方差分析, 复筛菌株 H40741 产果胶酶的酶活力较 H41133、H41134、H40982 三株菌的产果胶酶活力具有显著差异($p < 0.05$)。

2.2 出发菌株紫外诱变

结果表明紫外照射时间对菌株 H40741 的致死非常显著, 当照射时间为 240 s 时, 致死率可以达到 91% (图 3)。将紫外诱变 0、60、120、180、240、300、360 s 后的菌悬液稀释 1000 倍, 将稀释后的孢子悬液涂布于果胶平板培养基上, 28 ℃ 条件下恒温培养 3 d 进行初筛。实验发现, 诱变后的菌落大小差异显著($p < 0.05$), 甚至个别菌落难以形成孢子(图 4)。说明在紫外诱变过程中菌株不仅发生了正突变, 同时也发生了负突变^[36]。出发菌株 H40741 对紫外线较为敏感且果胶酶的酶活力比 H41133、H41134、H40982 三株菌都高, 是一株适宜于进行诱变育种的菌株。

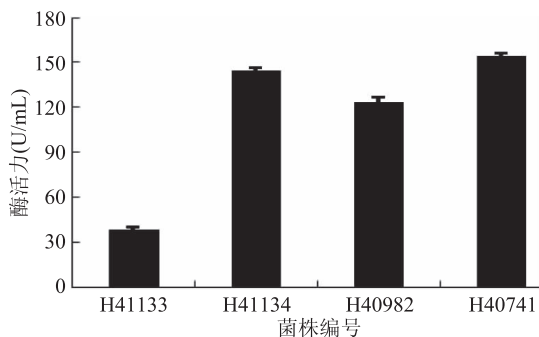


图2 复筛菌株产果胶酶的酶活力

Fig.2 Enzyme activity of pectinase produced by re-screening strains

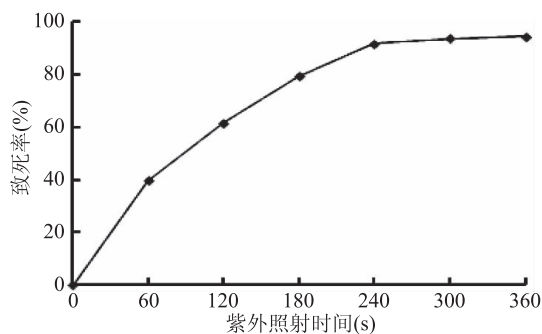


图3 紫外诱变致死率曲线

Fig.3 The curve of UV-mutation lethality

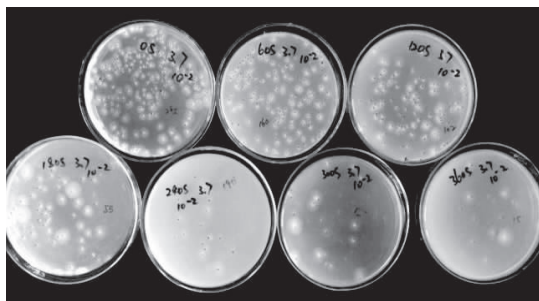


图4 紫外照射时间与菌的存活数

Fig.4 UV irradiation time and survival number of strains

注:从上到下、从左到右,诱变时间依次为

0、60、120、180、240、300、360 s。

2.3 紫外诱变菌株的筛选

结果显示各菌株的 Dp/Dc 比值均有提高(图5)。据方差分析,各菌株的 Dp/Dc 比值都有较显著的提高($p < 0.05$),其中 H40741-20 菌株提高的最为显著($p < 0.05$)(图6)。

将初筛所获得的 Dp/Dc 比值较大的 7 株黑曲霉突变株 H40741-2、H40741-3、H40741-19、H40741-20、H40741-42、H40741-57、H40741-61 分别进行液态发酵,并检测果胶酶的酶活力,最终筛选得到一株高产果胶酶的突变菌株 H40741-20,其果胶酶酶活力达到 462.84 U/mL,是出发菌株 H40741 的 3 倍(图7)。对酶活力值进行显著性分析发现,除 H40741-19 与 H40741-3, H40741-2 与 H40741-61 无显著性差异外($p > 0.05$),其余菌株间均有显著性差异($p < 0.05$)。因此,将果胶酶酶活力提高最多的诱变菌株

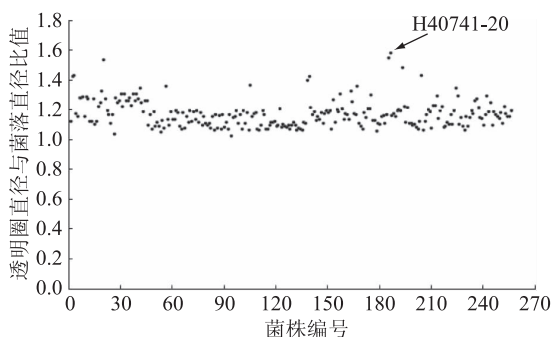


图5 264 株诱变菌株 Dp/Dc 比值

Fig.5 The ratio Dp/Dc of 264 mutant strains

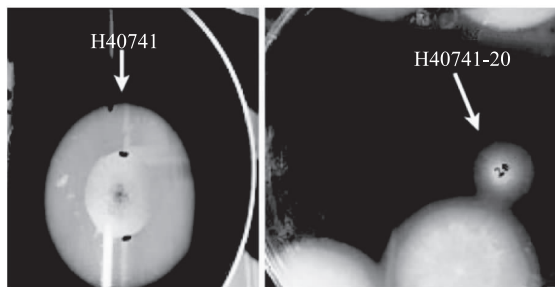


图6 出发菌株 H40741 与诱变菌株 H40741-20 的透明圈

Fig.6 Transparent circle of original strain H40741 and mutant strain H40741-20

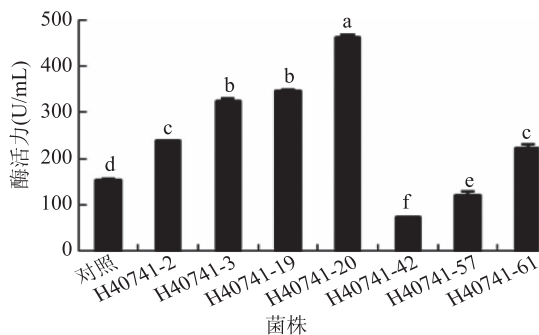


图7 七株 Dp/Dc 比值较大的黑曲霉突变菌株果胶酶酶活力

Fig.7 The enzyme activity of seven aspergillus

niger mutant strains with higher ratio Dp/Dc

注:图中不同字母代表在 Duncan 检验中差异显著($p < 0.05$)。

H40741-20 用于葡萄皮渣的固态发酵实验。

2.4 突变菌株形态学鉴定

突变株 H40741-20 在显微镜下的孢子囊形态,菌丛黑褐色,顶囊为大球形,小梗双层,分生孢子为球形,呈黑色,表面粗糙(图8),与唐文俊^[37]等人研究的黑曲霉菌体形态比较相符。通过与出发菌株对比发现,经过紫外诱导后的孢子囊明显小于出发菌株的孢子囊。

2.5 葡萄皮渣固态发酵

麦麸中含有纤维素、低聚糖、 β -淀粉酶等多种营养物质,其中纤维类物质约占 30%,糖类物质约占 70%^[38]。因此,麦麸可作为碳源与氮源,且具有一定的疏松度,能够给黑曲霉的生长提供充足的氧气。与麦麸相对比,葡萄皮渣中果胶物质约占 1.0%~1.6%^[39],而果胶酶属于诱导酶,葡萄皮渣既可作诱导

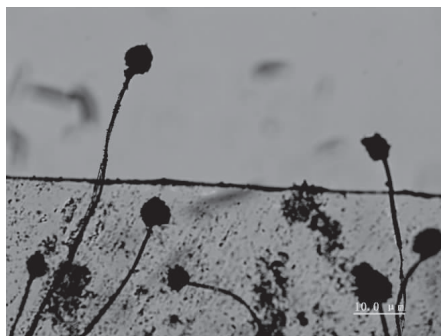


图8 突变株 H40741-20 在显微镜下的孢子囊形态

Fig.8 Sporangial morphology of mutant strain H40741-20 under the microscope
注:显微镜放大倍数为 100 倍。

物又可作碳源。添加葡萄皮渣能有效提高果胶酶的产量,且果胶酶活力最高能提高 266.91 U/mL。通过调整葡萄皮渣和麦麸的配比,不仅有利于提高果胶酶的产量,还能减少原料的浪费。研究发现,随着葡萄皮渣添加量每增加 20 g,果胶酶活力提高 150 U/mL 左右。当葡萄皮渣含量超过 50% 时,若继续增加其含量,菌丝的生长会更加旺盛,但果胶酶酶活力会随之降低(图 9)。因此,固体发酵培养基中葡萄皮渣与麦麸质的添加量分别为 50、50 g 最合适。

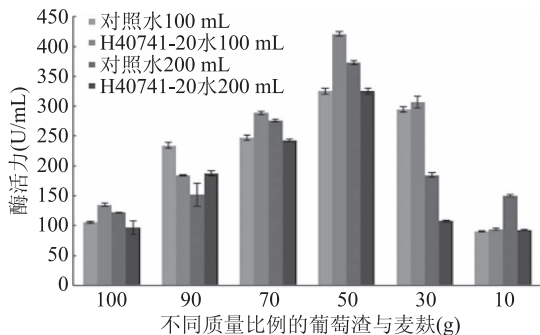


图9 不同质量的葡萄皮渣与麦麸发酵的酶活力

Fig.9 Enzyme activity of fermentation of grape skin residue and bran in different quality

3 结论

本研究采用液态发酵与紫外诱变获得产果胶酶活力最高的菌株 H40741-20, 将其与出发菌株 H40741 分别进行葡萄皮渣固态发酵。通过优化固体培养基配比,发现当葡萄皮渣 50 g、麦麸 50 g、水 100 mL 时,H40741-20 的酶活力最高(421.06 U/mL),较 H40741 提高 173.15%。因此,以葡萄皮渣为原料进行发酵生产果胶酶,既能做到资源的合理利用和降低环境污染,又能实现葡萄酒废弃资源利用的最大化。

参考文献

[1] 张丽芬,吴倩,陈复生,等.改性果胶结构、功能及方法的研究进展[J].粮食与油脂,2015(1):1-5.
[2] 彭小燕,木泰华,张苗,等.超高压下 Ca^{2+} 与 Na^+ 离子对甜菜果胶结构及流变性质的影响[J].中国农业科学,2015,48(21):4335-4346.

[3] 林伟铃,田宝玉,秦勇,等.果胶酶高产菌种的紫外诱变选育及其培养条件的响应面法优化[J].工业微生物,2010,40(2):5-9.
[4] 薛长湖,张永勤,李兆杰,等.果胶及果胶酶研究进展[J].食品与生物技术学报,2005,24(6):94-99.
[5] 杨闯,王俊玲,付源.果胶酶研究现状及在植物蛋白饲料工业中的应用[J].产业与科技论坛,2015(19):68-69.
[6] 俞惠明,蔡建林,刘宗芳,等.果胶酶在葡萄酒酿造中的作用及其实际应用[J].中外葡萄与葡萄酒,2010(7):65-68.
[7] 陈勇强,严芬,叶秀云,等.高产果胶酶菌株的筛选鉴定及其发酵条件研究[J].中国食品学报,2014,14(2):138-145.
[8] 蒋红菊,杨加志,宋加妹,等.高产果胶酶菌株选育及发酵产酶条件优化的研究进展[J].中国酿造,2010,29(11):1-5.
[9] Hassan B, Ali S. A Review on Biotechnological Impact of Pectinases in Industries [J]. Journal of Scientific Research in Pharmaceutical, chemical & Biological Sciences, 2016, 2 (1): 1-7.
[10] 陈林,王明兹,柯崇榕,等.黑曲霉原生质体诱变选育果胶酶高产菌株[J].微生物学杂志,2011,31(5):27-30.
[11] 杜国军,刘晓兰,郑喜群.产果胶酶黑曲霉的筛选及诱变育种[J].农业与技术,2008,28(2):68-70.
[12] 朱瑞敏,邱晨曦,韩悦,等.微生物育种物理诱变技术 ARTP 的应用进展[J].生物技术世界,2016(4):20-23.
[13] 牛国强,黄艳,张薄博,等.常压室温等离子诱变选育高产橙、黄色素红曲菌研究[J].核农学报,2016,30(4):654-661.
[14] 郝建安,杨波,姜天翔,等.常压室温等离子体诱变选育微生物絮凝剂高产菌株[J].生物技术通讯,2015,26(6):805-808.
[15] 张丽娜,明有山,肖艺,等.紫外诱变黑曲霉微生物转化甘草皂苷[J].辽宁科技大学学报,2016,39(2):126-129.
[16] Qu E J, Li W J, Liu Y X, et al. Inducing and screening of high producing pectinase *Aspergillus niger* Strain. [J]. 农业科学与技术(英文版),2010,25(3).
[17] 陈勇强,叶秀云,梁燕辉,等.产果胶酶菌株-黑曲霉的复合诱变及产酶条件研究[J].中国食品学报,2016,16(1):99-107.
[18] 余秋生,杨海波,杨冠军,等.紫外诱变黑曲霉筛选高产果胶酶菌株[J].中国酿造,2012,31(6):134-137.
[19] Jafari N, Jafarizadehmalmiri H, Hamzehmivehroud M, et al. Optimization of UV irradiation mutation conditions for cellulase production by mutant fungal strains of *Aspergillus niger* through solid state fermentation[J]. Green Processing & Synthesis, 2017.
[20] Izmirlioglu G, Demirci A. Strain selection and medium optimization for glucoamylase production from industrial potato waste by *Aspergillus niger* [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 96(8):2788-2795.
[21] 葛龙,赵艳,章亭洲.固态发酵技术的特点与应用[J].饲料与畜牧:新饲料,2010(8):54-56.
[22] 彭丽霞,黄彦芳,刘翠平,等.酿酒葡萄皮渣的综合利用[J].酿酒科技,2010,2010(10):93-96.
[23] 刘军,李进,曲健,等.葡萄皮渣的综合利用[J].中外葡萄(下转第 162 页)

now a realistic option for industry[J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2010, 49(9): 885-900.

[12] Zhang LF, Liu ZL. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(5): 731-737.

[13] Chen YY, Gu XH, HUang SQ, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 429-435.

[14] 刘常金, 赵锦, 江慎华, 等. 丁香抗氧化活性物质超声波-微波协同提取技术[J]. 农业机械学报, 2014, 45(11): 223-229.

[15] Chan CH, Yusoff R, Ngho GC, et al. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(37): 6213-6225.

[16] Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(4): 426-436.

[17] Liu RL, Song SH, Wu M, et al. Rapid analysis of fatty acid profiles in raw nuts and seeds by microwave-ultrasonic synergistic in situ extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food chemistry, 2013, 141(4): 4269-4277.

[18] Wang G, Luo Z, Zhang J, et al. Modes of occurrence of fluorine by extraction and SEM method in a coal-fired power plant from Inner Mongolia, China [J]. Minerals, 2015, 5(4): 863-869. DOI: 10.3390/min5040530.

[19] 吴雪辉, 黄永芳, 高强, 等. 肉桂精油的超临界 CO₂ 萃取工艺及成分研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(1): 69-71.

[20] 张鹰, 王满生, 曾新安, 等. 金柚柚皮精油提取条件优化及其抑菌性能研究[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 54-58.

[21] 戴喜来, 熊子文, 罗丽萍. 响应面法优化野艾蒿多糖的超

声波提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 93-97.

[22] 郑炯, 陈静霞, 余静, 等. 白胡椒挥发油中化学成分的 GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 110-112.

[23] 王娟, 央金卓嘎, 黄惠华. 茶树花精油超高压、超声波与微波辅助萃取工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 146-148.

[24] 涂招秀, 熊伟, 何华庆, 等. 响应面法优化槿柑果皮精油提取新技术工艺研究[J]. 江西化工, 2011, (3): 58-61.

[25] Thomas RE, Kamat SD, Kamat DV. HPTLC and HPLC analysis of *T. chebula* extracts prepared using microwave and ultrasonication assisted extraction methods [J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2015, 4(1): 192-196.

[26] 刘梦莹, 江慎华, 王煌, 等. 恒温超声辅助提取诃子 FRAP 类抗氧化活性物质的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 238-243.

[27] Lai J, Xin C, Zhao Y, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of antioxidants from black soybean (*Glycine max* var) sprouts using response surface methodology [J]. Molecules, 2013, 18(1): 1101-1110.

[28] Chen Y, Gu X, Huang S, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 429-435.

[29] Yin X, You Q, Jiang Z, et al. Optimization for ultrasonic-microwave synergistic extraction of polysaccharides from *Cornus officinalis* and characterization of polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 83: 226-232.

[30] Lou ZX, Wang HX, Song Z, et al. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(16): 2441-2446.

(上接第 129 页)

与葡萄酒, 2006(3): 51-53.

[24] Wang Y S, Wang X J, Fa-Di L I, et al. Effect of grape pomace on artificial rumen fermentation [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013.

[25] 令博, 田云波, 吴洪斌, 等. 微生物发酵法制取葡萄皮渣膳食纤维的工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 178-182.

[26] 邓红梅, 周天. 野生葡萄皮渣中花青素的含量及其抗氧化性和抑菌性研究[J]. 中国食品添加剂, 2016(9): 90-94.

[27] 王春灵. 葡萄皮渣的高效利用[J]. 石河子科技, 2016(2): 13-13.

[28] 李力. 酿酒葡萄皮渣果胶提取的最佳工艺研究[J]. 食品工业, 2013(11): 84-86.

[29] 张飞, 岳田利, 费坚, 等. 果胶酶活力的测定方法研究[J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 134-137.

[30] 武莹莹, 叶汉英. 果胶酶微生物筛选和酶活测定方法研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 57-60.

[31] 王小敏, 吴文龙, 阎连飞, 等. 分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究[J]. 食品工业科技, 2007(5): 227-229.

[32] Solispereyra S, Favelatorres E, Gutiérrezrojas M, et al. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state

fermentation at high initial glucose concentrations. [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1996, 12(3): 257-260.

[33] 徐冲, 关艳丽, 冯敏. 产果胶酶菌株的筛选[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(5): 66-68.

[34] Peng Y K, Sun L L, Wei S, et al. Investigation of enzymatic activity, stability and structure changes of pectinase treated in supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Cleaner Production, 2016, 125: 331-340.

[35] 曹珂珂, 李妍, CAO Ke, 等. 利用葡萄渣黑曲霉固态发酵产果胶酶的研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(3): 83-86.

[36] 何新舟, 查东风, 黄汉峰, 等. 亚硝基胍诱变丙酸杆菌选育高产抑菌物质菌株[J]. 安徽农业科学, 2016(2): 18-20.

[37] 唐文俊, 夏建业, 储炬, 等. 黑曲霉发酵过程中菌体形态的分析方法建立及应用[J]. 生物工程学报, 2015, 31(2): 291-299.

[38] 江和源, 吕飞杰, 台建祥. 小麦胚和小麦麸皮的成分及其开发利用[J]. 粮食与饲料工业, 1999(10): 5-6.

[39] 王玲, 曾树林, 谢聘, 等. 刺葡萄皮渣中果胶的联产提取工艺研究[J]. 酿酒科技, 2012(4): 105-108.